

# IDENTIFICATION DU PIGMENT BLEU-VERT DES ECAILLES DU POISSON DE MER, COLOLABIS SAIRA BREVOORT.

著者	NOMURA Tadasu, TSUCHIYA Yasuhiko
journal or publication title	Tohoku journal of agricultural research
volume	16
number	3
page range	213-224
year	1966-03-10
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/29473">http://hdl.handle.net/10097/29473</a>

# IDENTIFICATION DU PIGMENT BLEU-VERT DES ECAILLES DU POISSON DE MER, *COLOLABIS* *SAIRA* BREVOORT.

Par

Tadasi NOMURA et Yasuhiko TSUCHIYA

*Laboratoire de Biochimie Marine, Faculté d'Agriculture,  
Université du Tohoku, Sendai, Japon*

(Reçu, le 15 décembre 1965)

Les nombreux travaux publiés jusqu'à ce jour (1-7) sur les pigments tégumentaires bleu-vert des poissons, témoignent de l'intérêt des recherches chimiques en ce domaine. Cependant, la plupart des études publiées sont encore rudimentaires et les propriétés physico-chimiques des pigments sont encore mal connues, à cause des difficultés rencontrées pour l'obtention de ces pigments naturels en grandes quantités.

Nous avons isolé<sup>(8)</sup> le pigment bleu-vert des écailles du poissons de mer, *Cololabis saria* Brevoort, à l'état cristallisé, et avons proposé momentanément le nom "Ichthyoverdine", n'ayant eu alors qu'une trop faible quantité de pigment pour l'identifier avec certitude. Nous avons précédemment exposé quelques propriétés de l'ester méthylique de ce pigment: ses spectres ultra-violet et visible<sup>(9)</sup>, son point de fusion, ses solubilités, quelques réactions spécifiques, son action sur la lumière polarisée, son comportement lors des chromatographies sur papier et sur colonne<sup>(10)</sup>. Nous avons alors comparé ces propriétés avec celles d'un ester méthylique de la biliverdine IX<sub>a</sub><sup>(11)</sup>, et conclu à l'identité du pigment isolé et de la biliverdine IX<sub>a</sub> authentique.

Nous avons fait depuis, l'analyse élémentaire de ce pigment, la comparaison de son spectre infra-rouge avec celui d'une biliverdine IX<sub>a</sub> synthétique, et la comparaison de ses Rf par chromatographie sur couche mince, avec ceux de cette biliverdine IX<sub>a</sub>. D'ailleurs nous décrivons l'étude du produit de réduction de ce pigment et la comparaison de propriétés de ce produit avec celui provenant de la réduction de la biliverdine IX<sub>a</sub>.

## Partie Expérimentale

### *Synthèse de l'ester diméthylique de biliverdine IX<sub>a</sub>.*

La bilirubine IX<sub>a</sub> (B.D.H.) a d'abord été recristallisée dans le chloroforme;

le spectre d'absorption présente bien le maximum attendu à  $450\text{m}\mu$ , la bilirubine pure a été oxydée par la benzoquinone<sup>(12)</sup>, esterifiée par l'alcool méthylique chlorhydrique à 10 pour-cent, et ensuite rechromatographiées sur colonne d'alumine etc. Le rendement est de 24 pour-cent (Tableau 1).

Tableau 1. Résumé schématique de la technique de la synthèse de l'ester diméthylque de la biliverdine IX<sub>α</sub>.

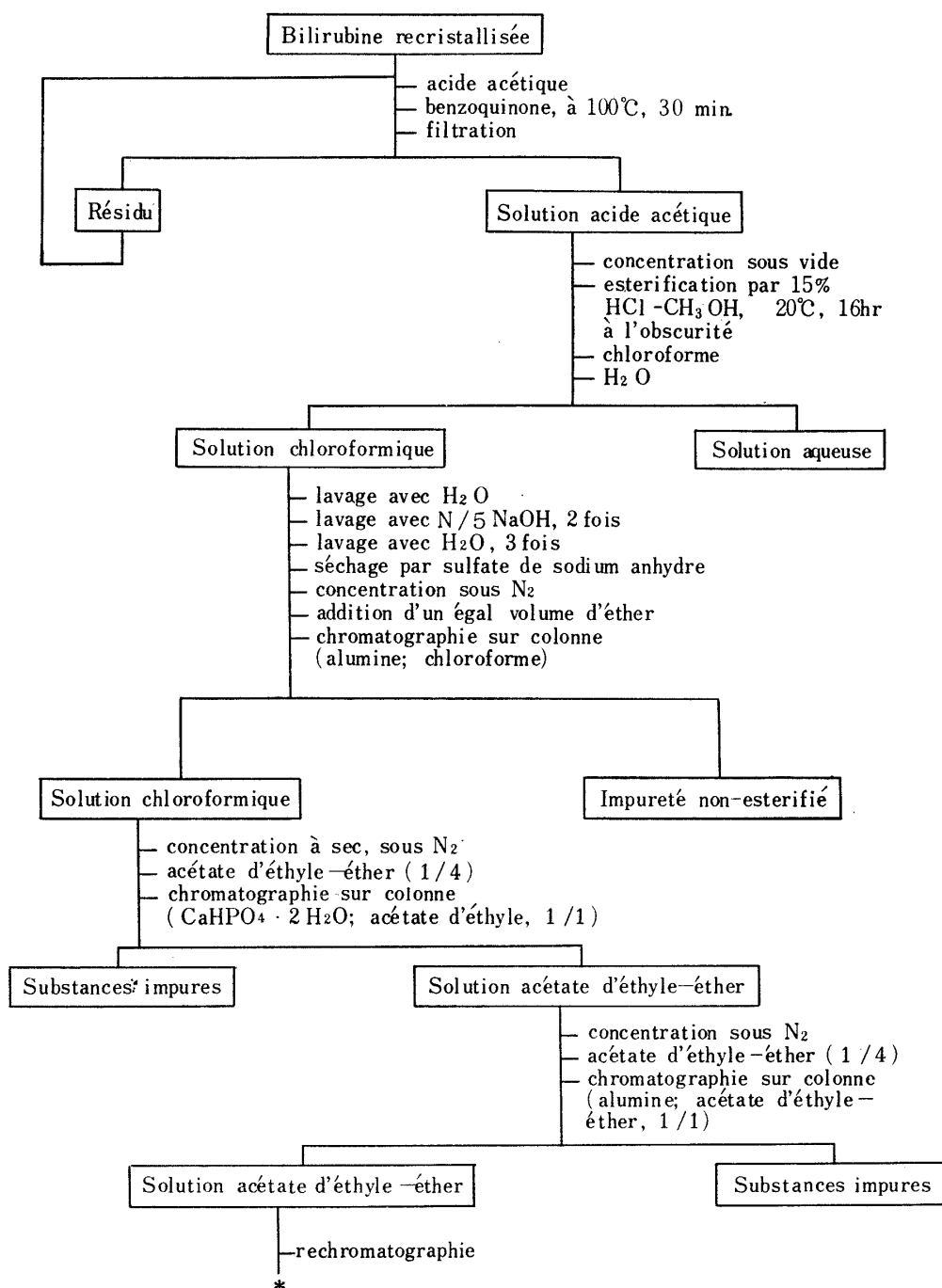
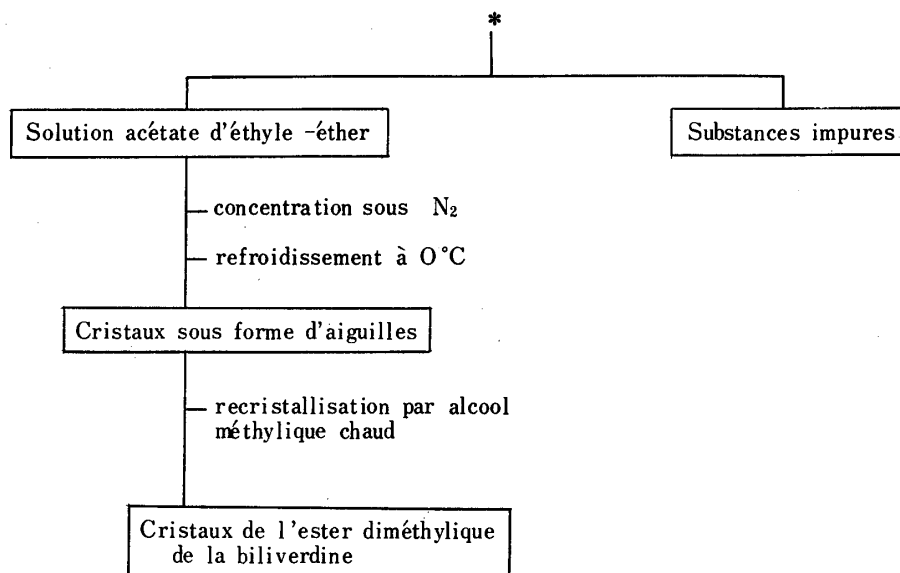


Tableau 1. (Suit)

*Isolement de l'ichthyoverdine*

L'ester diméthylique de l'ichthyoverdine a été obtenu par la méthode précédente<sup>(8)</sup> légèrement modifiée (Tableau 2). 10 mg de l'ester diméthylique de l'ichthyoverdine ont été isolés sous forme cristallisée à partir de 200kg d'écaillés de *Cololabis saira*.

*Spectre d'absorption dans l'ultra-violet et dans le visible*

Comme nous avons décrit précédemment<sup>(9)</sup>, les positions des maximums d'absorption des verdines dans l'ultra-violet et dans le visible sont assez différentes selon les auteurs. Nous avons déterminé ici de nouveau la courbe d'absorption et les coefficients d'extinction des maximum d'absorption à l'aide d'un spectrophotomètre Hitachi modèle EPU.

*Micro-analyse*

Les dosages de carbone, hydrogène et azote ont été effectués dans le laboratoire de micro-analyse de l'Institut de Recherches Chimiques en Solutions Nonaqueuses de notre université.\*

*Spectre infra-rouge.*

Pour les trois pigments biliaires (l'ester diméthylique de l'ichthyoverdine, l'ester diméthylique de la biliverdine IX<sub>a</sub>, et la bilirubine), les spectres infra-rouge ont été enregistrés avec un spectrophotomètre Perkin-Elmer 21, muni d'un prisme en chlorure de sodium, en utilisant des pastilles de bromure de sodium.\*\*

\* Nous remercions vivement le Professeur Y. Kitahara pour son aide favorable.

\*\* Nous remercions aussi le Professeur T. Nozoe et le Professeur S. Itoh des avis compétents qu'ils ont bien voulu nous donner.

*Chromatographie sur couche mince*

Le développement des plaques se fait de la même manière que pour les chromatographies ascendantes sur papier, dans un mélange de solvants tel que l'on ait en présence un solvant polaire et un autre non polaire; pour nos séparations nous avons utilisé des mélanges: benzène-acétate d'éthyle-alcool éthylique (90/20/7.5). Nous avons utilisé comme adsorbants pour les chromatographies préparatives: un mélange acide silicique-amidon de riz-eau (9.5 g-0.5 g-25 ml). Toutes les plaques ont été activées à 97°C durant 15 minutes avant l'emploi.

Tableau 2. Résumé schématique de la technique de l'isolement de l'ichthyoverdine.

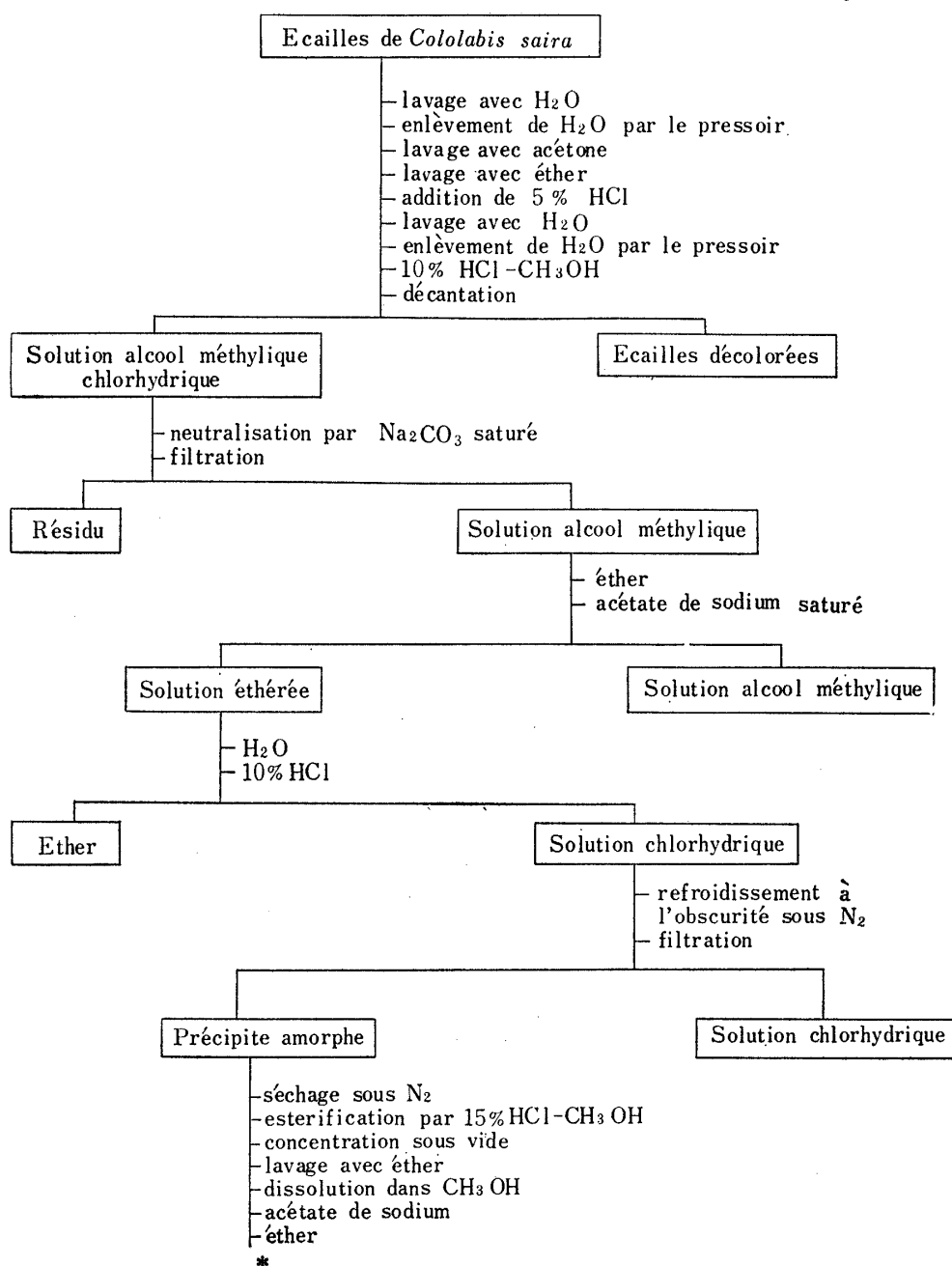
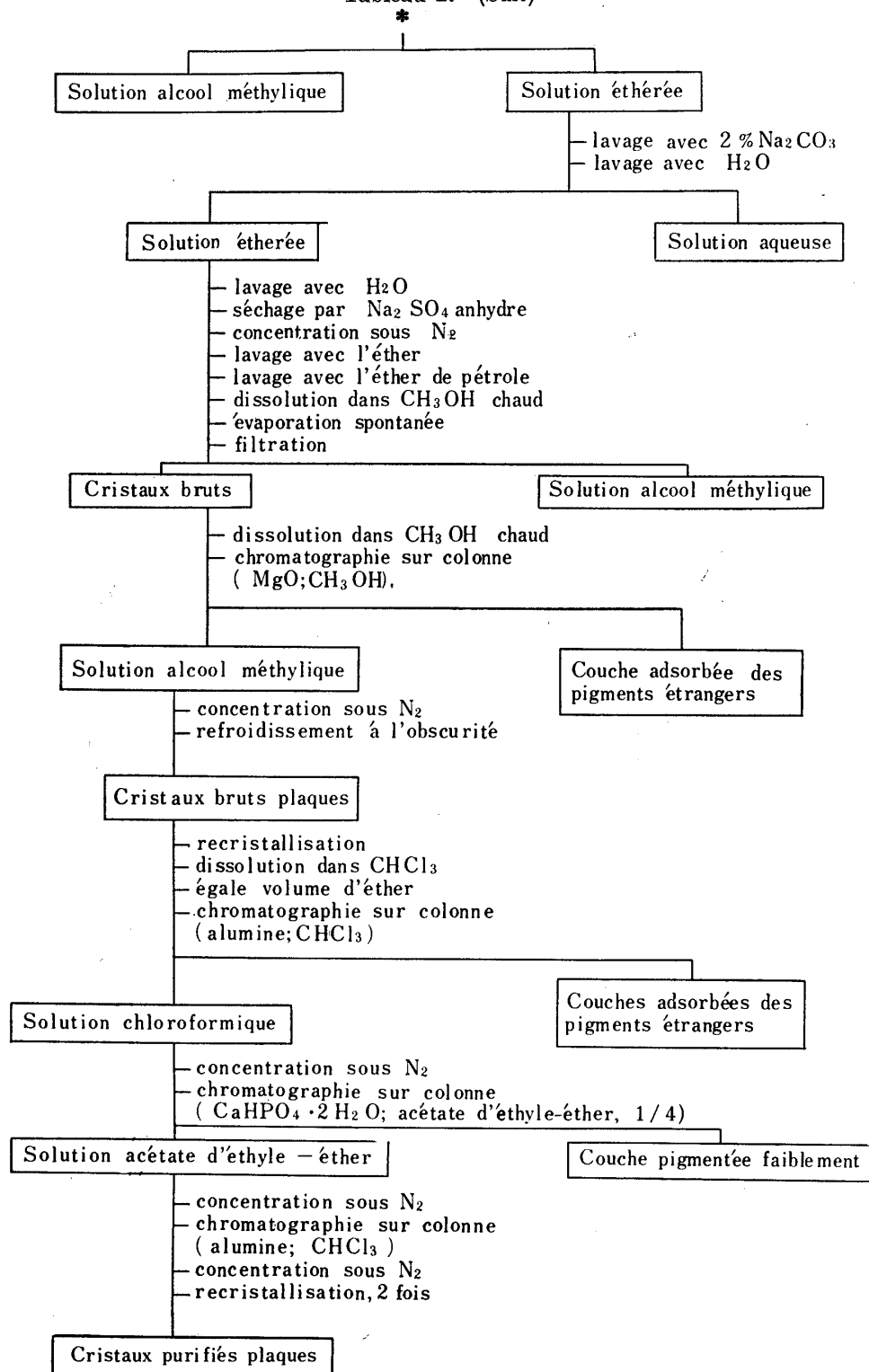


Tableau 2. (Suit)



*Réduction par le dithionite de sodium.*

30 $\mu$ g des chlorhydrates de l'ichthyoverdine et de la biliverdine sont dissous respectivement dans 2 ml d'alcool méthylique. Les solutions sont neutralisées par

la potasse alcoolique N/10, on ajoute quelques gouttes d'eau et 0.1 mg de dithionite de sodium. Les solutions changent immédiatement de couleur: bleu-vert→vert-jaune→jaune. Les solutions jaunâtres sont utilisées pour les réactions colorées spécifiques. Les chromatographies sur papier sont effectuées comme exposé précédemment<sup>(10)</sup>. Le spectre d'absorption du produit réduit de l'ichthyoverdine a été mesuré dans le mélange chloroforme-éthanol à l'aide d'un spectrophotomètre Beckman modèle DU.

### Résultats et Discussion

*Spectre d'absorption dans l'ultra-violet et dans le visible.*

Les maximums d'absorption et les coefficients d'extinction de l'ester diméthylque de l'ichthyoverdine et de la biliverdine IX<sub>a</sub> sont montrés sur le tableau

Tableau 3 Maximums d'absorption et coefficients d'extinction des esters diméthylques de l'ichthyoverdine et de la biliverdine IX<sub>a</sub>.

l'ester diméthylque de l'ichthyoverdine				l'ester diméthylque de la biliverdine IX <sub>a</sub>					
Nomura et Tsuchiya				Nomura et Tsuchiya			Tixier (1945)		
	$\lambda_{\max}$	$\log \epsilon$	$\epsilon_{mM}$	$\lambda_{\max}$	$\log \epsilon$	$\epsilon_{mM}$	$\lambda_{\max}$	$\log \epsilon$	$\epsilon_{mM}$
$\lambda_I$	665	4.20	16	665	4.20	16	665	4.20	16
$\lambda_{II}$	384	4.74	55	384	4.72	53	384	4.72	53
$\lambda_{III}$	318	4.35	23	318	4.34	22	316	4.38	24
$\lambda_{IV}$	284	4.29	20	284	4.29	20	282	4.29	19.5

Solvant: chloroforme

$\lambda_{\max}$ : longueur d'onde du maximum d'absorption

$\epsilon$ : coefficient d'extinction molaire

$\epsilon_{mM}$ : coefficient d'extinction milli-molaire

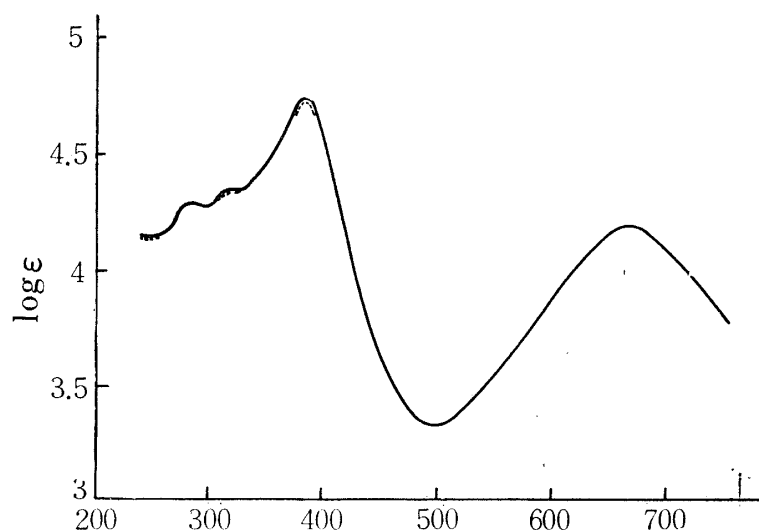


Fig. 1. Spectres d'absorption de l'ester diméthylque de l'ichthyoverdine (—) et de la biliverdine IX<sub>a</sub> (---) dans le chloroforme.

3 et la figure 1. Nous avons vérifié ici que l'ichthyoverdine est identique à la biliverdine IX<sub>α</sub>.

#### Micro-analyse

L'ester diméthylque de l'ichthyoverdine isolé des écailles a été soumis à l'analyse élémentaire.

Les difficultés rencontrées dans l'analyse élémentaire de diverses verdines sont illustrées par les chiffres suivants:

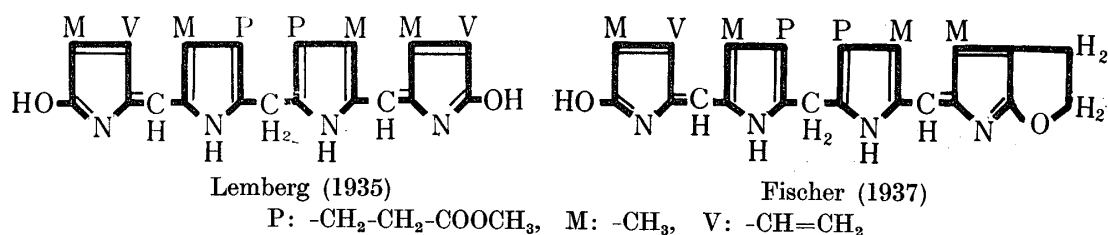
	2.855 mg	H <sub>2</sub> O 1.547 mg	CO <sub>2</sub> 7.168 mg		
	3.084 mg	N <sub>2</sub> (23.4°C, 756.2 mm)	0.253 cm <sup>3</sup>		
				C%	H%
trouvé:				68.51	6.07
calculé pour C <sub>35</sub> H <sub>38</sub> O <sub>6</sub> N <sub>4</sub>				68.83	6.27
trouvé pour l'ester diméthylque de la biliverdine IX <sub>α</sub> (C <sub>35</sub> H <sub>38</sub> O <sub>6</sub> N <sub>4</sub> ):					N%
Lemberg (1932)				68.10	6.50
Fischer (1940)				68.54	6.34
Tixier (1952)				68.85	6.22
					9.23
					9.18
					9.05
					9.14
					9.17

Cependant, avec l'ester diméthylque de l'ichthyoverdine (P.F. 207°C)<sup>(8)</sup>, les chiffres trouvés sont en accord avec la théorie (calculé de la formule de l'ester diméthylque de la biliverdine, C<sub>35</sub>H<sub>38</sub>O<sub>6</sub>N<sub>4</sub>).

#### Spectre infra-rouge.

A notre connaissance, seul Shindo<sup>(13)</sup> a décrit le spectre infra-rouge de la biliverdine; bien qu'il y ait assez de travaux sur les autres pigments tétrapyrroliques apparentés: bilirubine<sup>(14)</sup>, stercobiline, diverses porphyrines<sup>(15)(16)</sup> et dérivés chlorophylliens<sup>(17)(18)(19)</sup>. Les spectres infra-rouge de l'ester diméthylque de la biliverdine IX<sub>α</sub> synthétique et la bilirubine sont montrés sur la figure 2.

On constate que le spectre infra-rouge de l'ester diméthylque du pigment isolé est identique à celui de la biliverdine, et que les spectres de ces deux pigments diffèrent beaucoup de celui de la bilirubine. Nous pensons que les échantillons employés par Shindo, certains produits de magasins chimiques, ne sont pas purs, car ses spectres sont mal résolus et mauvais. Bien que Craven<sup>(14)</sup> ait adopté la structure proposée par Fischer pour la bilirubine, à notre avis le spectre infra-rouge de la bilirubine ne soutient pas une telle structure. Ceci parce que le pic aigu caractéristique de noyau furanique manque dans la région 885~870cm<sup>-1</sup> (Figure 2).





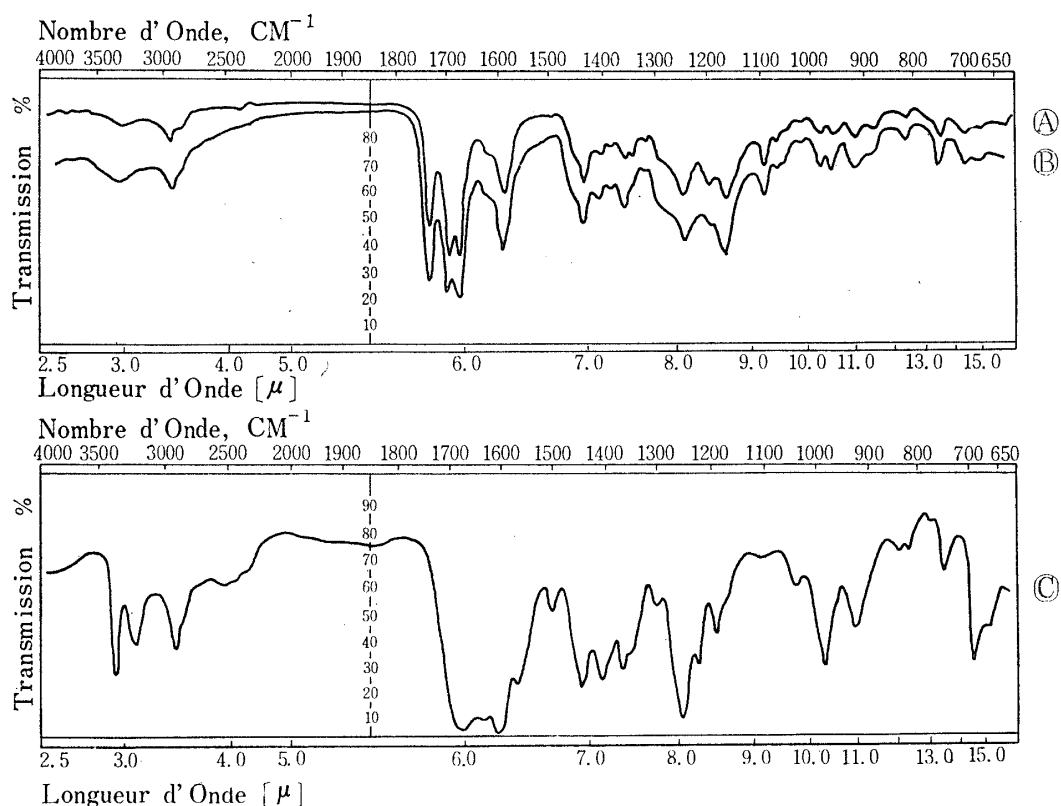


Fig. 2 Spectres infra-rouge de la bilirubine, de l'ester diméthylrique de l'ichthyoverdine et de celui de la biliverdine IX<sub>a</sub>.

A: ester diméthylrique de la biliverdine

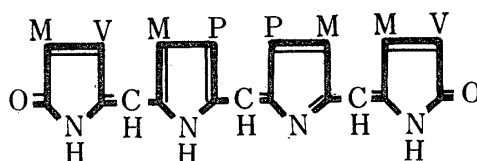
B: ester diméthylrique de l'ichthyoverdine

C: bilirubine

(prisme de chlorure de sodium, pastille de bromure de sodium)

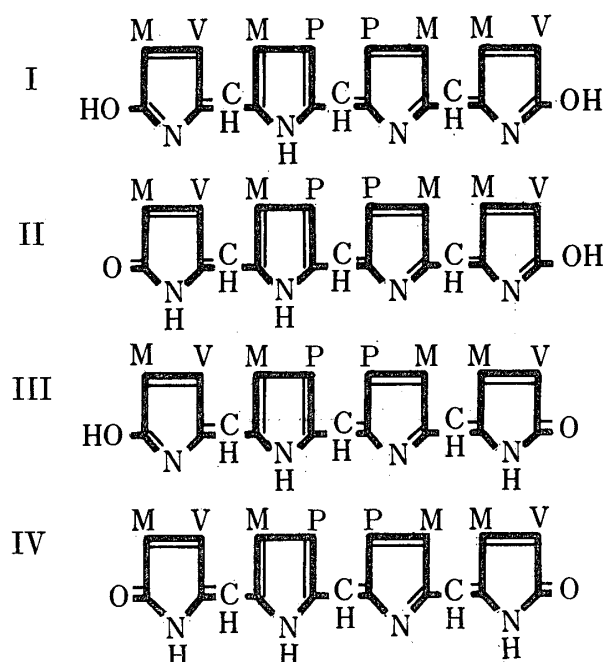
Le spectre infra-rouge publié par Craven montre absence des bandes des vibration de valence-OH ( $\nu_{OH}$ ) et -NH ( $\nu_{NH}$ ). Weigle et coll.<sup>(19)</sup> et Falk<sup>(15)</sup> ont écrit que l'apparition de la bande de vibration de valence-NH est difficile à détecter. Nos résultats sur les esters diméthylriques des verdines présentent aussi des bandes  $\nu_{NH}$  et  $\nu_{OH}$  mal résolues. D'autre part, nous assignons l'absorption à  $1675\text{ cm}^{-1}$  comme caractéristique des vibration des groupement fonctionnels-CO d'une lactame. Cette observation nous conduit à penser que la structure de la biliverdine IX<sub>a</sub> ne possède pas de groupement hydroxyle aux position 1'et 8'.

Gary et coll, dans sa publication<sup>(20)(21)</sup>, ont proposé récemment une nouvelle structure pour la biliverdine IX<sub>a</sub>, à la suite de résultats de la titration spectrophotométrique:



Gray et coll. (1961)

Notre résultat soutient la proposition de Gray et coll., et cette hypothèse est aussi appuyée par le travail de Plieninger et coll.<sup>(22)</sup>. Cependant, il nous semble que les verdines existent sous des formes tautomères suivant le milieu. La biliverdine à l'état cristallisé, au moins dans la condition de la mesure, possède la structure IV stable, en accord avec la structure proposée par Gray et coll. Les autres bandes assignées sont indiquées dans le tableau 4.



**Tableau 4.** Liste des bandes d'absorption infra-rouge observées pour la bilirubine, l'ester diméthylque de l'ichthyoverdine et celui de la biliverdine IX<sub>a</sub>. (Prisme de chlorure de sodium, pastille de bromure de sodium).

bande d'adsorption	Nombre d'ondes, cm <sup>-1</sup>		
	bilirubine	ester diméthylque de la biliverdine	ester diméthylque de l'ichthyoverdine
$\nu_{\text{NH}}$	3400	3325	3320
$\nu_{\text{CH}_2}$ ; $\nu_{\text{CH}_3}$	2850-2880	2940	2930
$\nu_{\text{CO}}$ , carboxylique	2500-3200	-	-
$\nu_{\text{C}=\text{C}}$ ; $\nu_{\text{C}=\text{N}}$	1640	1699	1699
$\nu_{\text{CO}}$ , lactame	1687	1676	1675
$\delta_{\text{NH}}$ ; $\delta_{\text{C}=\text{C}}$	1611	1620	1622
squelette pyrrolique	1566	1593	1591
$\delta_{\text{CH}_2}$	1443	1438	1438
$\nu_{\text{CO}}?$	1248; 931	1247; 927	1243; 923
$\delta_{\text{NH}}$ (dans le plan)?	1184; 985	1164; 985	1163; 985
porphyne?	1110; 755	1090; 753	1090; 753
$\delta_{\text{NH}}$ (hors du plan)?	690	710	710

#### Chromatographie en couche mince.

Demole<sup>(23)</sup> a donné le Rf 0.06 pour la biliverdine dans le même solvant et

presque la même technique, mais il n'a pas donné le Rf de son ester. Dans notre cas, les Rf de deux esters des verdines sont également 0.77 et la bilirubine 0.88 (Figure 3). La co-chromatographie des verdines ne présente qu'une tache. Ainsi, le chromatogramme en couche mince montre aussi que l'ester diméthylque de l'ichthyoverdine est identique à celui de la biliverdine IX<sub>α</sub>.

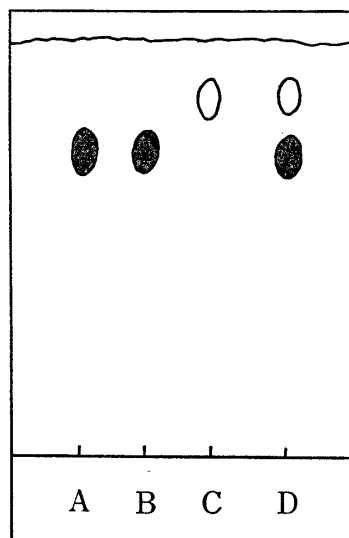


Fig. 3 Chromatogramme en couche mince de l'ester diméthylque de la biliverdine et de l'ichthyoverdine.

Adsorbant: acide silicique (Mallinckrodt, 100 mesh) 9.5, amidon de riz 0.5 g, eau 25 ml.

Activation des plaques: 97°C, 15 min.

Solvant: benzène-acétate d'éthyle-alcool éthylique (90/20/7.5)

A: ester diméthylque de la biliverdine (Rf 0.77)

B: ester diméthylque de l'ichthyoverdine (Rf 0.77)

C: bilirubine (Rf 0.88)

D: mélange (A+B+C)

#### *Réduction par le dithionite de sodium.*

Fischer<sup>(24)</sup> et Tixier<sup>(25)</sup> ont employé le dithionite de sodium comme réducteur pour les pigments biliaires. Nous avons aussi réduit l'ichthyoverdine par celui-ci. Le produit réduit donne une réaction de Gmelin positive et une réaction de Ehrlich positive. Les chromatographie sur papier ont identifié ce produit comme étant la bilirubine. Le spectre d'absorption dans le visible de ce produit est concordant avec le maximum d'absorption de la bilirubine authentique dans le mélange alcool éthylique-chloroforme (1/1) (Figure 4).

Ces résultats permettent de constater que le produit de réduction de l'ichthyoverdine est la bilirubine. Il est donc évident que l'ichthyoverdine est la biliverdine.

L'ensemble de nos résultats, y compris nos travaux déjà publiés, identifie l'ichthyoverdine à la biliverdine IX<sub>α</sub>. Par conséquent, nous pensons que le nom d'ichthyoverdine, que nous avons proposé antérieurement doit être supprimé dès maintenant.

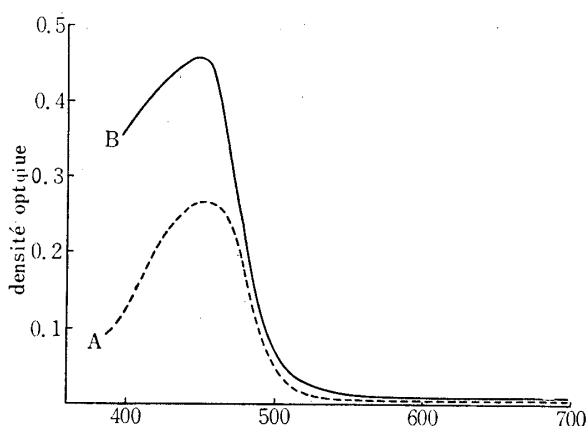


Fig. 4 Spectres d'absorption dans le visible de la bilirubine et du produit de réduction de l'ichthyoverdine par le dithionite de sodium.

A: bilirubine recristallisée dans la solution éthanol-chloroformique (1/1).

B: produit de réduction de l'ichthyoverdine dans le même solvant.

### Résumé

Nous avons comparé les propriétés physico-chimiques de deux pigments bleu-vert: l'ester diméthylque de l'ichthyoverdine (le pigment des écailles de *Cololabis saira* Brevoort) et l'ester diméthylque de la biliverdine IX<sub>α</sub> synthétique.

Des résultats, des spectres d'absorptions dans l'ultra-violet, dans le visible, dans l'infra-rouge, de l'analyse élémentaire et de la chromatographie en couche mince, il est permis de penser que l'ichthyoverdine est identique à la biliverdine IX<sub>α</sub>. De plus, nous avons prouvé que le produit de réduction de l'ichthyoverdine était la bilirubine. Par conséquent, l'ensemble de nos résultats permet d'abandonner le nom d'ichthyoverdine dès maintenant.

D'un autre côté, le résultat du spectre infra-rouge de la verdine nous conduit à penser que la verdine ne possède pas de groupement hydroxyle aux positions 1' et 8', et que sa structure est stabilisée sous forme lactame.\*

### References

- 1) Von Zeyneck, R. (1901), Z. Physiol. Chem., **34**, 148.
- 2) Von Zeyneck, R. (1902). *ibid.*, **36**, 569.
- 3) Willstaedt, H. (1941). Enzymologia., **9**, 260.
- 4) Çağlar, M. (1945). Nature., **155**, 670.
- 5) Çağlar, M. (1950). Commus. Faculté Sci. Univ. Ankara., **3**, 265.
- 6) Fontaine, M. (1941). Bull. Inst. Océanog., nos. 792, 793.
- 7) Fox, D.L. & N. Millot. (1954). Experientia., **X/4**, 185.

\* Après avoir terminé la rédaction de ce mémoire, nous trouvons une publication de v.H.Dobeneck et E. Brunner (Zeit. Physiol. Chem. **341**, 157, 1965), proposant pour la bilirubine IX<sub>α</sub> une structure *lactame*. Ce résultat est en accord avec nos conclusions concernant la structure de la biliverdine IX<sub>α</sub>.

- 8) Tsuchiya, Y. & T. Nomura. (1955). Tohoku J. Agr. Res., **IV**, 1, 75.
- 9) Tsuchiya, Y. & T. Nomura. (1958). *ibid.*, **IX**, 2, 81.
- 10) Tsuchiya, Y. & T. Nomura. (1959). Compt. rend. Soc. Biol., **CLIII**, 5, 873.
- 11) Tsuchiya, Y. & T. Nomura. (1961). *ibid.*, **CLV**, 1, 34.
- 12) Tixier, R. (1945). Ann. Inst. Océanog., **22**, 343.
- 13) Shindo, M. (1957). Acta medica. (Igaku Kenkyu, en japonais), **27**, 1, 1; **27**, 1, 10.
- 14) Craven, C.W., Reissmann, K.R. & H.I. Chinn. (1952). Anal. Chem., **24**, 7, 1214.
- 15) Falk, J.E. & J.B. Willis. (1951). Aust. J. Sci. Res., ser. 4A, 579.
- 16) Gray, C.H., Neuberger, A. & P.H.A. Sneath. (1950). Biochem. J., **47**, 87.
- 17) Falk, J.E. (1964). "Porphyrins and Metalloporphyrins" p. 87., B.B.A. Library, vol. 2., Elsevier Publ. Co., Amsterdam.
- 18) Holt, A.S. & E.E. Jacobs. (1955). Plant. Physiol., **30**, 553.
- 19) Weigle, J.W. & R. Livingston. (1953). J. Am. Chem. Soc., **75**, 2173.
- 20) Gray, C.H., Lichtarowicz-Kulczycka, A., Nicholson, D.C. & Z. Petryka (1961). J. Chem. Soc., **440**, 2264, 2268, 2276.
- 21) Gray, C.H. (1963). "Bile Pigments", Comprehensive Biochemistry vol. 9., p. 98., ed. par M. Florkin & E.H. Stotz., Elsevier Publ. Co.,
- 22) Plieninger, H. & M. Decker. (1956). Ann., **598**, 198.
- 23) Demole, E. (1958). J. Chromatog., **1**, 24.
- 24) Fischer, H. & H. Plieninger. (1942). Z. Physiol. Chem., **274**, 231.
- 25) Tixier, R. (1952). Mémoires Mus. Nat. Hist. Nat., **V**, 2, 41.